



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

ایجاد موتاژنز در سویه ی مولد آنزیم لیپاز ترموفیل به روش موتاسیون با اشعه UV و بهینه سازی اجزای محیط کشت به کمک روش های آماری جهت افزایش تولید آنزیم

توسط:

مژده سلیمانی کرمانی

استادان راهنما:

دکتر حمید فروتن فر

دکتر مجتبی شکیبایی

شماره پایان نامه: ۱۰۸۱

بهار ۱۳۹۸



Kerman University of Medical Sciences
Faculty of Pharmacy

Pharm. D Thesis

Title:

**UV light induced mutagenesis of thermophile lipase producing bacterial strain
and statistical optimization of cultural conditions for increasing of enzyme
production**

By:

Mozhdeh Soleimani-Kermani

Supervisors:

Dr. Hamid Forootanfar

Dr. Mojtaba Shakibaie

Spring 2019

Thesis No.: 1081

خلاصه فارسی

مقدمه: آنزیم‌های میکروبی سختی‌دوست یکی از منابع حیاتی آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت هستند. لیپاز استفاده گسترده‌ای در صنایع و بیوتکنولوژی دارد. برای افزایش تولید این آنزیم از روش‌های جهش‌زایی مختلف و روش‌های آماری استفاده می‌گردد که این‌ها منجر به ایجاد موتانت مناسب و محیط کشت بهینه می‌شوند. هدف این مطالعه، در قدم اول جهش‌زایی از طریق اشعه UV در گونه *Bacillus atrophaeus* FSHM2 می‌باشد که این نوع جهش‌زایی ساده‌ترین و معمولترین روش برای ایجاد موتانت‌های مناسب میکروبی است. بعد از آن بهینه‌سازی اجزای محیط کشت، نقشی حیاتی در افزایش بازده آنزیمی دارد. سپس تاثیر برخی متغیرها بر بهره‌وری لیپاز تولید شده توسط موتانت انتخابی از طریق طراحی آزمایش و مدل پیشنهادی در محیط کشت مشخص می‌شود.

روش‌ها: *Bacillus atrophaeus* FSHM2 در معرض نور UV (۴۵-۵ دقیقه) جهش یافت و مورد طراحی آزمایش کسری ارتقا یافته به ^{1R}SM قرار گرفت. ابتدا، بهترین موتانت بعد از قرارگیری گونه وحشی به مدت ۴۵ دقیقه در معرض نور UV حاصل شد. بعد از آن ۱۱ فاکتور (روغن زیتون (X_1), گلوکز (X_2), سوکروز (X_3), مالتوز (X_4), عصاره مخمر (X_5), اوره (X_6), آمونیوم سولفات (X_7), تریپتون (X_8), سدیم کلرید (X_9), کلسیم کلرید (X_{10}) و سولفات روی (X_{11})) برای طراحی پلاکت-برمن انتخاب شدند که سپس این طراحی به ^{2C}CD ارتقا یافت.

نتایج: این مطالعه نشان می‌دهد که ۵ موتانت به دست آمده در محیط دارای رودامین B زیر نور UV (۳۵۰ نانومتر) هاله‌ی نارنجی رنگ فلورسنت تولید می‌کنند. این موتانت‌ها برای فعالیت لیپازی مورد بررسی

قرارگرفتند که از بین آن‌ها ۳ موتانت UV-10، UV-30 و UV-45 (به ترتیب ۲۸۹۶/۷ واحد بر لیتر، ۳۱۸۶/۳ واحد بر لیتر و ۳۴۸۴/۸ واحد بر لیتر) فعالیت لیپازی چشم‌گیری نسبت به گونه وحشی (۱۷۲۰/۴ واحد بر لیتر) نشان دادند. بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز مربوط به موتانت UV-45 بود که بعد از موتاسیون در محیط کشتی حاوی ۵٪ روغن زیتون، ۶۹٪/۰ گلوکز، ۶۹٪/۰ سوکروز، ۲/۵٪ مالتوز، عصاره مخمر ۷/۰ گرم بر لیتر، اوره ۴۴/۰ گرم بر لیتر، سولفات آمونیوم ۴۴/۲ گرم بر لیتر، تریپتون ۱۹/۱ گرم بر لیتر، سدیم کلراید ۶۱/۱ گرم بر لیتر، کلسیم کلراید ۸۱/۳ گرم بر لیتر و سولفات روی ۲/۱۴ گرم بر لیتر، ۳/۵۵۰۵ واحد بر لیتر پیش‌بینی شد که با میزان اندازه‌گیری شده $83/3 \pm 5161/3$ واحد بر لیتر فعالیت لیپازی موافق بود. این مقدار در مقایسه با سویه وحشی آن ۳ برابر افزایش فعالیت لیپاز را نشان می‌دهد.

کلید واژه‌ها: *Bacillus atrophaeus* FSHM2، لیپاز، جهش‌زایی UV، طراحی آزمایش

Abstract

Introduction: Microbial enzymes of extremophilic origin serve as a vital source of stable industrial enzyme. Lipase has been widely applied in different biotechnological and industrial processes. For overproduction of microbial important enzymes, mutagenesis and statistical optimization approaches have been used that led to the most appropriate strain and cultural conditions. The aim of this research, in first step is inducing mutagenesis in bacterial strain of *Bacillus atrophaeus* FSHM2 by UV ray which is among the simplest and most commonly applied mutagenesis methods used for developing more suitable microbial mutants. Optimization of the culture medium components plays a crucial role to enhance enzyme production yields. So, the influences of some variables on lipase productivity of the selected mutant were determined using statistical experimental design and the related model was applied for the optimization of culture medium components.

Methods: *Bacillus atrophaeus* FSHM2 exposed under UV light (5–45 min) and factorial experimental design augmented to response surface methodology. Firstly, a UV-induced mutant (designated as UV-45) was developed after the exposure of wild strain to UV irradiation for 45 min. Thereafter, 11 factors (olive oil (X_1), maltose (X_2), glucose (X_3), sucrose (X_4), yeast extract (X_5), tryptone (X_6), urea (X_7), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_8), NaCl (X_9), CaCl_2 (X_{10}), and ZnSO_4 (X_{11})) chosen for Plackett–Burman experimental approach augmented to central composite design was employed to optimize medium components.

Results: The maximum lipase production of 5505.3 U/L were predicted in medium containing 5% of olive oil, 0.69% of glucose, 0.69% of sucrose, 2.5% of maltose, yeast extract (0.7 g/L), urea (0.44 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.44 g/L), tryptone (1.19 g/L), NaCl (1.61 g/L), CaCl_2 (3.81 g/L), and ZnSO_4 (1.42 g/L). A mean value of 5161.3 ± 83.3 U/L of lipolytic activity was acquired from real experiments. To sum up, the lipolytic activity of wild type strain (1720.4 U/L) increased by 3-fold after UV-induced mutagenesis and medium components optimization (5161.3 U/L).

Keywords: *Bacillus atrophaeus* FSHM2, lipase, UV mutagenesis, Experimental design



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی

پایان نامه خانم مژده سلیمانی کرمانی دانشجوی داروسازی ورودی ۹۲ به شماره: ۱۰۸۱

تحت عنوان:

"ایجاد موثرتر در سویی مولد آنزیم لپاز ترموپیل به روش مومایسون با اشعه UV و بهینه سازی اجزای محیط کشت

به کمک روش های آماری جهت افزایش تولید آنزیم"

استاد راهنما:

۱- دکتر حمید فروتن فر

۲- دکتر مجتبی شکیبایی

هیئت محترم داوران به ترتیب حروف الفبا:

۱- دکتر بهزاد بهنام

۲- دکتر صالحه صبوری

۳- دکتر محمدحسن مصطفی

در تاریخ ۹۸/۰۲/۱۷ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) ۲۰
(با حروف) به تصویب رسید.

دکتر یکتا پورسجادی
رئیس اداره پایان نامه

دکتر محمود رضا حسینی
رئیس دانشکده

